

RINGKASAN

Pengembangan dan Validasi Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi pada Analisis Andrografolida dalam Bahan Baku dan Tablet Fraksi Etil Asetat *Andrographis paniculata*

Pada pengembangan produk fitofarmaka dari bahan baku fraksi etil asetat *Andrographis paniculata*, senyawa andrografolida digunakan sebagai senyawa marker. Selain merupakan salah satu metabolit sekunder yang terbesar, andrografolida memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Suatu produk fitofarmaka harus memenuhi persyaratan mutu, keamanan dan khasiat. Oleh sebab itu perlu dilakukan standarisasi dan kontrol kualitas pada bahan baku dan sediaan herbal. Namun, analisis senyawa kimia dalam tanaman dan sediaan herbal menunjukkan beberapa masalah disebabkan komponennya yang kompleks dan variasi senyawa kimia di dalamnya. Bahan baku dari tanaman menunjukkan variasi pada komposisi, kualitas dan efek terapi diakibatkan oleh waktu panen tanaman, bagian tanaman, pelarut pengestraksi dan metode produksi (Govindaraghavan and Sucher, 2015). Selain itu komposisi senyawa dalam sediaan produk herbal dapat berubah selama proses produksi (Pan et al., 2013).

Pada pengembangan metode KCKT untuk analisis andrografolida dalam *Andrographis paniculata* yang pernah dilakukan sebelumnya membutuhkan waktu retensi yang relatif cukup lama, laju alir tinggi, dan volume injeksi yang banyak. Pada metode KCKT detektor UV-VIS yang dilakukan Pholpana et al. (2004) menghasilkan waktu retensi paling cepat untuk andrografolida yaitu 3,2 menit menggunakan fase gerak metanol 50,5% dalam air dengan laju alir 1,2 ml/menit, volume injeksi sampel 1 µl dan panjang gelombang analisis 220 nm. Sedangkan pada metode KCKT yng dilakukan Jain et al. (2000) menghasilkan waktu retensi 4,9 menit untuk andrografolida menggunakan fase gerak asetonitril-air (70:30) dengan laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 20 µl dan panjang gelombang analisis 230 nm. Pada penelitian Akowuah et al. (2006) menghasilkan waktu retensi 5,8 menit untuk andrografolida menggunakan fase gerak metanol-air asam fosfat pH 2,8 (6:4) dengan laju alir 1 ml/menit, volume injeksi 20 µl dan panjang gelombang 210 nm. Penelitian Rao and Rathod (2015) and Sajeeb et al., (2015) menghasilkan waktu retensi lebih lama yaitu 7,2 menit dan 7,5 menit.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kondisi KCKT terpilih yang dapat memisahkan andrografolida dalam bahan baku dan sediaan tablet fraksi etil asetat *Andrographis paniculata* secara selektif dan reproduibel serta melakukan validasi metode analisis andrografolida dalam bahan baku dan sediaan tablet fraksi etil asetat *Andrographis paniculata* dengan metode KCKT terpilih. Bahan baku terdiri dari fraksi etil asetat 70% dan fraksi etil asetat 96%. Sedangkan sediaan tablet terdiri dari tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet fraksi etil asetat 96%.

Optimasi kondisi KCKT pada penelitian ini meliputi pemilihan panjang gelombang, jenis dan komposisi fase gerak, volume injeksi, laju alir fase gerak dan suhu kolom fase diam. Kondisi KCKT terpilih untuk analisis andrografolida dalam sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet fraksi etil asetat 96% pada kolom Reversed Phase (RP) C-18 yaitu panjang gelombang analisis andrografolida 228 nm, fase gerak metanol : air (asam fosfat pH 3) (50:50) dengan volume injeksi sampel 0,5µl, laju alir 0,3 ml/menit dan suhu kolom 30°C.

Uji prevalidasi dilakukan setelah didapatkan kondisi KCKT optimum. Uji prevalidasi ini meliputi uji kesesuaian sistem dan uji stabilitas. Hasil uji kesesuaian sistem menunjukkan keterulangan waktu retensi dan area yang memenuhi persyaratan yaitu $RSD < 1\%$, $RSD 0,099\%$ untuk keterulangan waktu retensi dan $RSD 0,725$ untuk keterulangan area. Hasil uji stabilitas menunjukkan analit dalam larutan metanol stabil ditandai oleh waktu retensi dan area selama waktu 1,2,3, 5 dan 24 jam pada suhu ruang selama waktu analisis memiliki perbedaan kurang dari 2% terhadap waktu retensi dan area larutan standar pada waktu awal dibuat (waktu 0 jam). Pada uji stabilitas sampel fraksi etil asetat 70% dan 96% menunjukkan kestabilan waktu retensi dan area puncak pada waktu 3, 5 dan 24 jam pada suhu ruang. Sedangkan pada tablet fraksi etil asetat 70% dan 96% stabil dalam 5 jam namun memberikan perbedaan lebih dari 2% ketika pada waktu 24 jam suhu ruang.

Setelah uji prevalidasi dilanjutkan validasi metode analisis. Pada hasil uji selektivitas, analit andrografolida pada sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet fraksi etil asetat 96% terpisah dengan baik dengan nilai $R_s > 1,5$ dan nilai $N > 2000$. Begitu pula hasil spiking standar andrografolida pada sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet fraksi etil asetat 96% juga menunjukkan pemisahan yang baik dengan nilai $R_s > 1,5$ dan nilai $N > 2000$.

Uji selektivitas secara kualitatif identitas puncak analit andrografolida menggunakan software dengan detektor PDA dinilai dengan Match Factor (MF) dan peak purity. Hasil nilai MF sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70%, tablet fraksi etil asetat 96% serta larutan sampel (fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70%, tablet fraksi etil

asetat 96%) yang di spiking dengan standar andrografolida menunjukkan nilai > 999 . Hasil peak purity sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70%, tablet fraksi etil asetat 96% serta larutan sampel (fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70%, tablet fraksi etil asetat 96%) yang di spiking dengan standar andrografolida menunjukkan nilai > 950 .

Uji linieritas dilakukan pada rentang konsentrasi 50-1000 ppm yang menghasilkan persamaan garis regresi $Y = 3,6538 X - 12,742$ dengan nilai $r = 0,9998$ dan $V_{xo} = 2\%$. Persamaan garis regresi dinyatakan linier bila nilai $r \geq 0,999$ dan nilai V_{xo} tidak boleh lebih dari 5% sehingga dapat disimpulkan pada kondisi KCKT terpilih, ada korelasi yang linier antara larutan standar andrografolida dengan area puncak.

Uji akurasi dibuat untuk mendapatkan nilai persen perolehan kembali atau % recovery analit dalam matriks dan sampel. Akurasi pada penelitian ini menggunakan dengan dua metode yaitu akurasi dengan membuat matriks yang tidak mengandung analit yaitu matriks dan akurasi dengan cara adisi standar pada sampel. Matriks dibuat dari seluruh bahan tambahan pembuatan tablet fraksi etil asetat *Andrographis paniculata*. Hasil % perolehan kembali analit andrografolida dalam matriks pada 80%, 100% dan 120% adalah $97,95\% \pm 0,25$; $98,02 \pm 0,84$; $101,72 \pm 0,43$. Akurasi andrografolida dalam matriks ini memenuhi persyaratan AOAC yaitu 95-102%.

Akurasi metode adisi standar dilakukan dengan menentukan nilai kadar sampel tanpa penambahan standar terlebih dahulu dengan cara menetapkan sampel tanpa penambahan standar (Concentration of Unfortified) (Cu) beberapa kali dan ditentukan rata-ratanya. Kemudian nilai % perolehan kembali ditentukan dengan cara membagi kadar hasil penambahan standar atau kadar yang diperoleh (concentration of fortified) (CF) dengan hasil jumlah kadar tanpa penambahan standar (Cu) dan kadar adisi atau (concentration of analyte addition) (Ca).

Hasil % perolehan kembali analit andrografolida dalam sampel fraksi etil asetat 70% pada 80%, 100% dan 120% adalah $99,83\% \pm 2,81$; $101,10 \pm 4,09$; $100,82 \pm 1,70$. Akurasi andrografolida dalam fraksi etil asetat 70% ini memenuhi persyaratan Association of Official Analytical Chemists (AOAC) yaitu 95-102% untuk rasio kadar analit dengan sampel $\geq 10\%$, rata-rata kadar fraksi etil asetat 70% yaitu 18,31%. Hasil % perolehan kembali analit andrografolida dalam sampel fraksi etil asetat 96% pada 80%, 100% dan 120% adalah $99,9\% \pm 1,23$; $100,07\% \pm 2,68$; $98,06 \pm 1,09$. Akurasi andrografolida dalam fraksi etil asetat 96% ini memenuhi persyaratan AOAC yaitu 95-102% untuk rasio kadar analit dengan sampel $\geq 10\%$, rata-rata kadar fraksi etil asetat 96% yaitu 28,64%.

Hasil % perolehan kembali analit andrografolida dalam sampel tablet fraksi etil asetat 70% pada 80%,100% dan 120% adalah $99,37\% \pm 2,39$; $100,40\% \pm 1,33$; $99,27 \pm 0,68$. Akurasi andrografolida dalam tablet fraksi etil asetat 70% ini memenuhi persyaratan AOAC yaitu 92-102% untuk rasio kadar analit dengan sampel $\geq 1\%$, rata-rata kadar fraksi etil asetat 70% yaitu 6,54%. Hasil % perolehan kembali analit andrografolida dalam sampel tablet fraksi etil asetat 96% pada 80%,100% dan 120% adalah $93,60\% \pm 0,83$; $96,94\% \pm 0,03$; $96,51 \pm 1,74$. Akurasi andrografolida dalam matriks ini memenuhi persyaratan AOAC yaitu 92-102% untuk rasio kadar analit dengan sampel $\geq 1\%$, rata-rata kadar tablet fraksi etil asetat 96% yaitu 7,47%.

Uji presisi pada penelitian ini dilakukan dengan dua cara yaitu repeatability dan intermediate precision. Penentuan repeatability dilakukan dengan cara menganalisis satu konsentrasi sampel 100% dengan replikasi 6 kali. Sedangkan intermediate precision dilakukan dengan cara menganalisis satu konsentrasi 100% dengan replikasi 6 kali pada hari yang berbeda. Uji presisi dilakukan dengan menganalisis standar dalam larutan matriks. Hasil uji repeatability standar dalam larutan matriks menghasilkan % RSD 1,60. Repeatability standar dalam matriks ini memenuhi syarat $\% \text{RSD} \leq 2,8\%$. Hasil uji intermediate precision standar dalam matriks pada hari yang berbeda selama 3 hari didapatkan nilai % RSD 1,37-1,60 %. Hal ini menunjukkan intermediate precision standar dalam matriks memenuhi persyaratan $\% \text{RSD} \leq 2,7\%$.

Uji repeatability dan intermediate precision juga dilakukan pada sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70%, tablet fraksi etil asetat 96% dengan menganalisis masing-masing sampel pada konsentrasi 100% sebanyak 6 kali. Uji intermediate precision sampel dilakukan pada dua hari yang berbeda. Hasil uji repeatability sampel yaitu fraksi etil asetat 70% nilai % RSD 2,19%, fraksi etil asetat 96% nilai % RSD 2,39%, tablet fraksi etil asetat 70% nilai % RSD 1,60%, tablet fraksi etil asetat 96% nilai % RSD 1,92. Sedangkan hasil intermediate precision sampel yaitu fraksi etil asetat 70% nilai % RSD 0,60-2,19%, fraksi etil asetat 96% nilai % RSD 2,01-2,39%, tablet fraksi etil asetat 70% nilai % RSD 1,53-1,60% , tablet fraksi etil asetat 96% nilai % RSD 1,73-1,92%. Hasil repeatability dan intermediate precision sampel menunjukkan memenuhi persyaratan $\% \text{RSD} \leq 2,8\%$.

Hasil batas deteksi dan batas kuantitasi diperoleh masing-masing yaitu 4,89 ppm dan 16,19 ppm. Nilai slope persamaan garis regresi dan sy (simpangan baku residual) dari rentang konsentrasi 10 - 60 ppm digunakan untuk menentukan batas deteksi dan batas kuantitasi.

Tahap terakhir yaitu tahap robustness yang dilakukan dengan perubahan pada panjang gelombang analisis dari 228 nm menjadi 224 nm dan 230 nm, perubahan laju alir dari 0,3 ml/menit menjadi 0,35 ml/menit serta suhu kolom dari 30°C menjadi 32°C. Hasil uji robustness menunjukkan %RSD pada panjang gelombang analisis 224 nm yaitu 0,099%, % RSD panjang gelombang 230 nm yaitu 0,741%. Sedangkan untuk %RSD pada laju alir 0,35ml/menit yaitu 0,854. Perubahan suhu kolom 28°C menghasilkan % RSD 0,263 dan suhu kolom 32°C menghasilkan % RSD 0,745. Berdasarkan hasil uji robustness, nilai persyaratan % RSD terpenuhi yaitu $RSD \leq 1\%$.

Dari hasil penelitian diperoleh kondisi KCKT terpilih yaitu menggunakan kolom RP C-18 (3,0 x 50 mm, 2,7 μ m), fase gerak metanol : air (asam phospat pH 3) (50:50), laju alir 0,3 ml/menit, volume injeksi sampel 0,5 μ l, suhu kolom 30°C. Kondisi KCKT ini telah memenuhi persyaratan validasi metode untuk analisis andrografolida dalam bahan baku fraksi etil asetat (70% dan 96%) dan tablet fraksi etil asetat (70% dan 96%) *Andrographis paniculata*.

Hasil pengembangan dan validasi metode KCKT pada analisis andrografolida dalam bahan baku fraksi etil asetat (70% dan 96%) dan tablet fraksi etil asetat (70% dan 96%) *Andrographis paniculata* diuji dengan sampel yang telah diuji degradasi paksa untuk melihat Stability indicating method (SIM). SIM merupakan prosedur analisis yang tervalidasi yang dapat mendeteksi perubahan sifat pada senyawa obat dan produk obat. SIM secara akurat menganalisis senyawa aktif tanpa pengaruh produk degradasi, pengotor proses, bahan tambahan atau kemungkinan pengotor yang lain.

SIM pada penelitian ini dilakukan dengan cara degradasi paksa (Forced degradation) terhadap bahan aktif standar andrographolide, matriks tablet, sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet fraksi etil asetat 96% yaitu perlakuan pemanasan dengan suhu 80°C, oksidasi dengan H₂O₂ 3%, hidrolisis asam dengan 0,5 N HCl dan basa dengan 0,5 N NaOH. Profil kromatogram hasil perlakuan degradasi paksa dibandingkan dengan profil kromatogram kontrol tanpa perlakuan.

Hasil Uji SIM menunjukkan kondisi KCKT terpilih mampu memisahkan dengan baik puncak analit andrografolida pada larutan standar, sampel fraksi etil asetat 70%, fraksi etil asetat 96%, tablet fraksi etil asetat 70% dan tablet etil asetat 96% dengan kemungkinan puncak hasil produk degradasi, pengotor proses, bahan tambahan atau kemungkinan pengotor yang lain pada perlakuan 0,5 N HCl dan perlakuan 0,5 N NaOH. Sedangkan hasil profil kromatogram perlakuan suhu 80°C dan oksidasi H₂O₂ menunjukkan profil kromatogram yang sama dengan kontrol tanpa perlakuan. Nilai Rs memenuhi persyaratan $\geq 1,5$

ABSTRACT

**Development and Validation of a HPLC for Determination of
Andrographolide in Raw Material and Tablet Ethyl Acetate Fractions
*Andrographis paniculata***

Ethyl acetate fractions from *Andrographis paniculata* has been developed as phytopharmaceutical products. Andrographolide which is the major active compound of *Andrographis paniculata* was determined as marker compound of ethyl acetate fractions of *Andrographis paniculata* products. To ensure the quality, efficacy and safety of the phytopharmaceutical products, a simple and selective analytical method becomes important for the determination of andrographolide in both the raw materials and products.

The purpose of this study was to develop and validate a simple and selective High Performance Liquid Chromatography (HPLC) for determination andrographolide in raw material and tablet ethyl acetate fractions *Andrographis paniculata*.

This method was performed using a RP-C18 Column (3.0 x 50 mm i.d., 2.7 μ m particle size) as stationary phase, column temperature was maintained at 30°C, isocratic mobile phase of methanol : water (pH 3.05 with phosphoric acid) (50:50 v/v) mobile phase with flow rate of 0.3 ml/minute, injection volume 0.5 μ l and detected at 228 nm.

The results showed that method was selective to separate andrographolide peak from other component with good resolution, retention time andrographolide was 2.5 minute. The data for calibration plots showed good linear relationship with $r^2 = 0.9996$ in the concentration range 50-1000 ppm. The limit of detection and Quantification were found 4.89 ppm and 16.19 ppm, respectively. The recovery method was found between 93.76 and 101.72% and the relative standard deviation method was found between 1.60% and 2.39%.

Key words : HPLC, Method validation, *Andrographis paniculata*, Andrographolide